

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aureobasidium thailandense* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

D. P. MENESES¹, E. GUDIÑA², A. I. RODRIGUES², F. FERNANDES¹, L. RODRIGUES², S. RODRIGUES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia

E-mail para contato: dayana_meneses@yahoo.com.br

RESUMO – Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que atuam na redução da tensão superficial e interfacial de líquidos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* utilizando água residual da produção de azeite (OMW) e água de maceração do milho (CSL). Um estudo preliminar verificou o efeito negativo de CSL na redução de tensão superficial. Dessa forma, foi realizado o planejamento fatorial completo (2²) para otimizar o meio de cultura utilizando extrato de levedura. O ponto de máxima redução de tensão (ΔTS) foi obtido com: 2 g/L de extrato de levedura, 1,5% (v/v) de OMW, 6 g/L de glicose com $\Delta TS = 28 \pm 2,6$ mN/m no caldo fermentado. Dessa forma o estudo mostrou que a produção do biossurfactante por *A. thailandense* sob condições otimizadas favoreceu a produção de um bom tensoativo.

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que atuam na redução da tensão superficial e interfacial de líquidos. Essas propriedades permitem a sua aplicação em diversas áreas comerciais, entre elas as indústrias alimentícia, farmacêutica, petroquímica, agrícola e de cosméticos (Sakthipriya *et al.*, 2015; Al-wahaibi *et al.*, 2014). Os biotensoativos possuem relevantes vantagens sobre os surfactantes de origem petroquímica, sendo as suas principais características a biodegradabilidade, estabilidade e o fato de conseguirem atuar sobre condições extremas de pH, temperatura e salinidade (Hassan *et al.*, 2016).

Uma diversidade de microrganismos, em sua maioria bactérias (*Pseudomonas* e *Bacillus*), leveduras (*Candida*) e, em menor quantidade, os fungos filamentosos são produtores de biossurfactantes (Desai; Banat, 1997). As leveduras possuem uma vantagem frente às bactérias, pois em sua maioria são organismos com *Status Generally Regarded as Safe* (GRAS) e, portanto, não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade para aplicação em indústria alimentícia e farmacêutica (Fontes; Amaral; Coelho, 2010).

O isolamento de novas culturas, bem como a utilização de substratos de baixo-custo e a otimização do processo fermentativo podem levar a síntese de biossurfactantes novos. A substituição das matérias-primas industrializadas por produtos e/ou subprodutos da indústria alimentícia tem se mostrado uma alternativa viável, pois corresponde a cerca de 30% do valor total da sua produção (Hazra *et al.*, 2010; Banat *et al.*, 2014).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi a produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense*, utilizando o resíduo da produção de azeite (OMW) e o extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio no meio de fermentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Inóculo

A cultura de *Aureobasidium thailandense* foi isolada do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) pelo Laboratório de Biotecnologia - LABIOTEC, da Universidade Federal do Ceará (UFC). O microrganismo foi identificado por técnicas de biologia molecular. O inóculo foi preparado em caldo YPD (*yeast peptone dextrose*) em *shaker* orbital a 200 rpm e 28 °C. A concentração de células para o início da fermentação foi de 1×10^7 cel/mL, na proporção de 5 % (v/v).

2.2 Produção do biossurfactante

A cepa de *Aureobasidium thailandense* foi submetida a testes preliminares com diferentes fontes de carbono (melaço, glicose, azeite de oliva e água residual da produção de azeite – OMW) e nitrogênio (extrato de levedura e água de maceração do milho – CSL). A partir desses resultados foi selecionado o meio de cultura que favoreceu a maior redução de tensão superficial do caldo fermentado: glicose (6 g/L), extrato de levedura (3 g/L), OMW (2% v/v), KH_2PO_4 (1 g/L) e o tempo de fermentação (48 horas) para realização do planejamento experimental.

2.2.3 Otimização do meio de cultura: A fermentação submersa foi realizada em *skaker* orbital por 48 horas, a 200 rpm e 28 °C, pH 5,5 em Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura. As amostras foram coletadas no intervalo de 24 horas e submetidas à centrifugação (4000 rpm, 15 min) para obtenção do sobrenadante para realização das análises.

Um fatorial fracionado 2^{3-1} , incluindo 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios, foi realizado com objetivo de analisar o efeito das fontes de nitrogênio e concentração de OMW (Tabela 1). Os valores foram gerados no *Software* Statística v 7.0 (Statsoft).

Tabela 1 – Fatorial fracionado (2^{3-1}) para selecionar as variáveis mais significativas segundo seus efeitos

Ensaio	Extrato de leveduras (g/L)	OMW (v/v) %	CSL (g/L)
1	1,0	1,0	2,0
2	2,0	1,0	1,0
3	1,0	3,0	1,0
4	2,0	3,0	2,0
5 (C)	1,5	2,0	1,5
6 (C)	1,5	2,0	1,5
7 (C)	1,5	2,0	1,5

Um planejamento fatorial completo (CCRD) foi realizado para otimizar as concentrações de extrato de levedura e da água residual da produção de azeite, que foram as variáveis com efeito positivo de acordo com o planejamento fatorial fracionado. O experimento foi conduzido com duas variáveis em dois níveis (2^2) incluindo 4 ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 2). O planejamento foi gerado no *Software Statistica v 7.0* (Statsoft).

Tabela 2 – Planejamento completo para otimização do meio de cultura (DCCR- 2^2)

Ensaio	OMW (v/v) %	Extrato de levedura (g/L)
1	1,00	1,50
2	1,00	4,50
3	1,00	1,50
4	3,00	4,50
5	0,58	3,00
6	3,41	3,00
7	2,00	0,87
8	2,00	5,12
9 (C)	2,00	3,00
10 (C)	2,00	3,00
11 (C)	2,00	3,00

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Determinação da tensão superficial: A tensão superficial foi medida no tensiômetro modelo alemão Kruss (K-6), que utiliza o método do anel (RODRIGUES *et al.*, 2006). As análises foram

realizadas com o sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra bruta, a uma temperatura de 25°C. Foram realizadas três medidas para cada ponto em estudo, sendo considerada a média aritmética dos resultados.

2.3.2 índice de emulsificação: O índice foi determinado de acordo com o método de Wei *et al.* (2005). Foram adicionados a tubos de ensaio 2,0 mL do sobrenadante e 2,0 mL de hexadecano. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e permaneceu em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação foi determinado pela Equação (1).

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_t} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

E_{24} = índice de emulsificação após 24 h (%)

$H_{emulsão}$ = Altura da emulsão (cm)

H_t = Altura total

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Diagrama de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}) pode ser observado através da Figura 1.

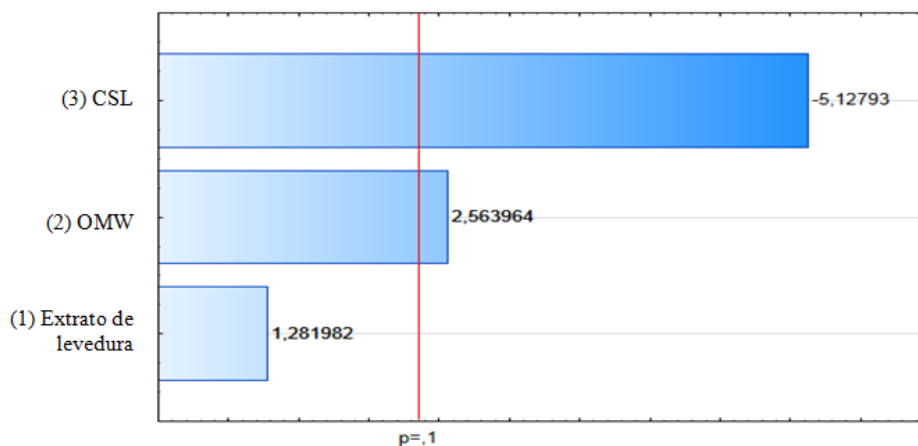


Figura 1 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado das fontes de nitrogênio e carbono na produção de biossurfactante por *A. thailandense*

Através do Diagrama de Pareto (Figura 1), observa-se que a água de maceração do milho (CSL) apresentou efeito significativo e negativo e a água residual (*olive mill wastewater* - OMW) apresentou efeito significativo e positivo ($p < 0,1$). O efeito negativo do CSL pode estar relacionado as condições limitantes de nitrogênio, pois segundo Santos *et al.* (2002) o uso de uma fonte lentamente metabolizada, pode ter um efeito semelhante aos baixos níveis de nitrogênio, que reduz a síntese de enzimas envolvidas na produção de lipídeos e consequentemente do biossurfactante. Portanto o extrato de levedura foi uma fonte de nitrogênio mais disponível a síntese do biossurfactante tendo apresentado um efeito positivo. Os resultados do planejamento composto central (DCCR) ² estão apresentados na Tabela 3 e sua respectiva superfície de reposta na Figura 2.

A produção do biossurfactante resultou em bons valores de redução de tensão superficial, na faixa de ΔTS 21 mN/m a 29 mN/m (Tabela 3). Fontes *et al.* (2012) relataram o aproveitamento de duas fontes de carbono na produção de surfactante por *Yarrowia lipolytica*, o estudo demonstrou que o glicerol e o suco de caju clarificado apresentaram ΔST de 22 mN/m e 18 mN/m, respectivamente.

Tabela 3 – Valores do planejamento composto central (²) para produção de biossurfactantes por *A. thailandense* durante 48 horas de fermentação

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	OMW (%)	Tensão superficial (mN/m)			E ₂₄ (%)
			TS _I	TS _F	ΔTS	
1	1,50	1,00	60	31	29	40,0
2	4,50	1,00	53	30	23	40,0
3	1,50	1,00	53	30	23	20,0
4	4,50	3,00	50	29	21	66,6
5	3,00	0,58	55	30	25	60,0
6	3,00	3,4	50	29	21	66,6
7	0,87	2,00	55	30	25	16,6
8	5,10	2,00	51	30	21	50,0
9 (C)	3,00	2,00	55	29	26	63,3
10(C)	3,00	2,00	56	29	27	60,0
11 (C)	3,00	2,00	58	30	28	63,0

TS_{I,F}: Tensão superficial inicial/final; ΔTS : redução da tensão superficial; E₂₄: índice de emulsão

O modelo de regressão obtido para prever a redução da tensão superficial está representado pela Equação 2. O $F_{\text{calculado}}$ (13,47) para o modelo estatístico foi maior que o F_{tabelado} (5,05) ao nível de confiança de 95%. Pode-se concluir que o modelo se ajusta aos dados experimentais ($R^2 = 0,93$), demonstrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados obtidos na Equação 2.

$$Z = 17,9 + 3,95x - 0,87x^2 + 5,85y - 1,97y^2 + 0,21xy \quad (2)$$

Onde:

Z = Redução da tensão superficial (mN/m);

Y = Concentração de OMW % (v/v);

X = Concentração de extrato de levedura (g/L).

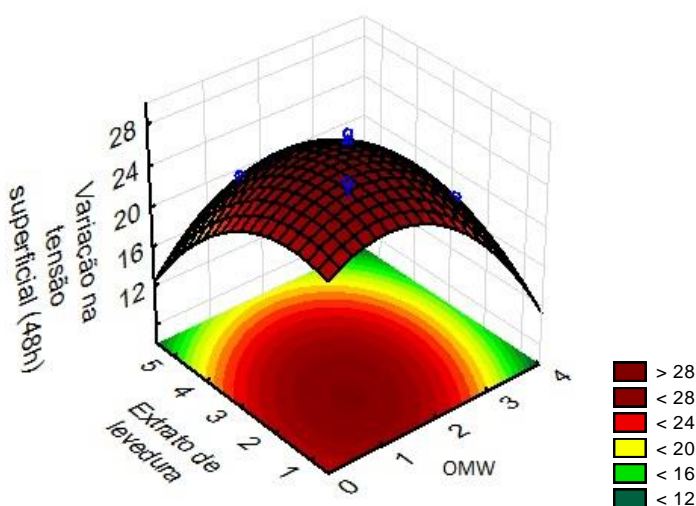


Figura 2– Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização das concentrações de extrato de levedura e OMW para produção de biossurfactante por *A. thailandense*.

Para a validação do planejamento (DCCR) foi realizado a repetição segundo os valores críticos (2 g/L de extrato de levedura e 1,5 % de OMW) gerados a partir da superfície de resposta. A Tabela 4 demonstra esses valores.

Tabela 4 – Resultados da validação do planejamento experimental (DCCR)

Tempo (h)	Δ Tensão superficial obtida (mN/m)	Δ Tensão superficial estimada (mN/m)
48	$28 \pm 2,6^a$	$28,16^a$

Valores são média \pm desvio. Valores com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com os valores observados na Tabela 4, os valores obtidos experimentalmente não

diferiram significativamente dos estimados pelo planejamento experimental (DCCR). A composição do meio de cultura otimizado reduziu em 66% a concentração de extrato de levedura utilizado nos ensaios iniciais. Pode-se observar que a concentração ideal da fonte hidrofóbica de carbono (OMW), favoreceu o aumento da produção do tensoativo, assim como citado por Bajaj *et al.* (2012) que descreveram a importância desse parâmetro para a síntese de biosurfactante.

Certos microrganismos possuem apenas a capacidade para produzir moléculas com características emulsificante, como reportado por Taran *et al.* (2012) a partir de *Haloarcula* sp. em meio contendo 4% de azeite de oliva ($E_{24}=40\%$). Não foram encontrados estudos para a levedura *A. thailandense* que possam relacioná-la com sua capacidade de produzir surfactantes, apenas outras espécies como *A. pullulans* (KIM *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÃO

Pode-se observar que o planejamento experimental foi uma ótima ferramenta para o estudo das condições ideais na produção do biosurfactante. O meio de cultura otimizado permitiu uma redução da tensão superficial de 28 mN/m em 48 horas de fermentação a partir de baixas concentrações de extrato de levedura (2 g/L) e glicose (6 g/L), utilizando 1,5% (v/v) do resíduo da produção de azeite de oliva (*olive mill waste water*) como fonte de carbono hidrofóbica.

Conclui-se que a cepa de *Aureobasidium thailandense* produziu um bom surfactante, sendo portanto, um bioproduto em potencial devido suas características tensoativas e emulsificante.

5. REFERÊNCIAS

- Abdel-Shafy, H. I.; Schories, G.; Mohamed-Mansour, M.S.; Bordei, V. Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater. *Desalin Water Treat.*, v. 56, n. 2, p. 305-314, 2015.
- BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced Production of Bioactive Sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by Design of Experiment Approach with Successive Purification and Characterization. *J. Oleo. Sci.*, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.
- BANAT, Ibrahim M *et al.* Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Front. Microbiol.*, v. 5, n. December, p. 697, 2014.
- DESAI, J.; BANAT, I. M Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

- FONTES, G. C. *et al.* Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J Biomed Biotechnol.*, v. 2010, p. 821306, jan. 2010.
- FONTES, G. C. *et al.* Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 29, n. 03, p. 483–493, 2012.
- HASSAN, Mariam *et al.* Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 82, p. 573–579, 2016.
- HAZRA, Chinmay *et al.* Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials, *J. Chem. Technol. Biot.*, v. 86, n. 2, p. 185–198, 2011.
- KIM, J. S.; LEE, I. K.; YUN, B. S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. *PloS one*, v. 10, n. 4, p.122917, jan. 2015.
- RODRIGUES, L. R. *et al.* Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53, *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 49, n. 1, p. 79–86, 2006.
- SANTOS, A. S. *et al.* Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 223, n. 3, p. 143–151, 2002.
- SAKTHIPRIYA, N; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. International Biodeterioration & Biodegradation Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins, *Int Biodeterior Biodegradation*, v. 105, p. 168–177, 2015.
- TARAN, Mojtaba *et al.* Surface active agent production from olive oil in high salt conditions and its process optimization. *Pol J Chem Technol.*, v. 14, p. 30–34, 2012.
- WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Chem Eng J Bioch Eng.* 27, 146–154. 2005.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

